基于线粒体 DNA COⅡ基因的亚洲玉米螟中国不同地理种群遗传分化及基因流研究

李　菁[1]，张　颖[1]，王振营[1,*]，何康来[1]，王　强[2]
(1. 中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193；
2. 北京城市学院生物技术学部，北京 100083)

摘要：本文通过对中国亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée) 17 个地理种群的线粒体 COⅡ基因进行序列分析，对中国亚洲玉米螟种群间的遗传分化程度和基因流水平进行了初步研究。在获得的 413 条序列样本中共发现了 34 个变异位点、35 种单倍型。总体单倍型多样性指数 *Hd* 为 0.811，种群内单倍型多样度在 0.424 ~ 0.862 范围内。17 个种群间的平均基因流(*Nm*)为 2.02。总群体的固定系数 *Fst* 为 0.234。AMOVA 分子方差分析结果表明中国玉米螟的遗传分化主要来自种群内部(76.45%)。各种群的 Tajima's *D* 值中性检验符合中性突变，说明中国亚洲玉米螟在历史上没有出现群体扩张，群体大小稳定。各地理种群的遗传距离与地理距离间不具有显著的相关性。各地理种群中的单倍型在系统发生树上散布在不同的分布群中，缺乏明显的地理分布格局。

关键词：亚洲玉米螟；地理种群；线粒体 COⅡ基因；单倍型；遗传分化；基因流
中图分类号：Q968　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2010)10-1135-09

Genetic differentiation and gene flow among different geographical populations of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae) in China estimated by mitochondrial COⅡ gene sequences

LI Jing[1], ZHANG Ying[1], WANG Zhen-Ying[1,*], HE Kang-Lai[1], WANG Qiang[2] (1. State Key Laboratory for the Biology of the Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Biotechnology, Beijing City University, Beijing 100083, China)

Abstract: To investigate the genetic differentiation and gene flow among different populations of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée), in China, we analyzed COⅡ sequences of mitochondrial DNA in 17 geographical populations. In the total 413 COⅡ gene sequences obtained, 34 variable sites and 35 haplotypes were observed. The mean haplotype diversity of all populations was 0.811, whereas it varied from 0.424 to 0.862 within population. The average gene flow (*Nm*) among the 17 populations was 2.02. The overall *Fst* value was 0.234. Molecular variance (AMOVA) analysis indicated that a high proportion of the total genetic variance was attributable to variations within populations (76.45%). The Tajima's *D* value neutrality test results suggest that for the Asian corn borer, there might be no population expansion, so their population sizes were steady. The genetic distance was not significantly correlated with the geographical distance between populations. The phylogenetic tree revealed no obvious geographical pattern for the prevalence and distribution of the haplotypes.

Key words: *Ostrinia furnacalis*; geographic population; mitochondrial COⅡ gene; haplotype; genetic differentiation; gene flow

亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée)在系统分类上属鳞翅目(Lepidoptera)草螟科(Crambidae)秆野螟属 *Ostrinia*，是世界性的玉米害虫，给玉米生产造成严重的经济损失。其寄主范围广，除主要为

基金项目：转基因生物新品种培育科技重大专项(2008ZX08011-003)；国家"十一五"支撑计划课题(2006BAD08A06)；国家玉米产业技术体系资金资助
作者简介：李菁，女，1983 年生，河北石家庄人，博士研究生，研究方向为昆虫分子生物学，E-mail: jinglee211@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wangzy61@163.com
收稿日期 Received: 2010-03-19；接受日期 Accepted: 2010-09-15

害玉米外，还为害高粱、谷子、棉花和甘蔗等多种重要的粮食作物和经济作物(王振营等，2000)。亚洲玉米螟在我国分布十分广泛，其分布区跨越了很广的经纬度地理范围，各地的自然环境、植被类群、耕作制度、寄主植物和种植的玉米品种差异较大。玉米螟在不同的地理分布区具有不同的化性，我国自北向南 1 年可发生 1 ~ 7 代(胡明峻和孙伯欣，1979)。亚洲玉米螟成虫扩散能力强，且不排除部分个体随气流远距离迁飞的可能(王振营等，1994)。由于玉米螟成虫具有相对较强的飞行扩散能力，这种非远距离的扩散若在某种条件下连续或渐次地发生，经过若干代(年)后，则有可能使得相邻的、不同步的生态区域的种群之间发生基因交流。

对于大多数物种，由于环境因子的不对称性，以及生物行为习性的差异，可能导致基因流的不随机性，使区域种群间出现不同程度的遗传差异。种群遗传结构多样性的产生，为种群间进一步分化甚至形成新的物种提供了机会(Avise，1992)。随着分子系统地理学(molecular phylogeography)的兴起与发展，使得以分子生物学技术为手段、在分子水平上研究物种间及物种内不同种群形成现有分布格局的历史原因和演化过程成为可能(Avise，1998；王静等，2001)。由于动物线粒体 DNA (mtDNA)具有母系遗传、进化速率快，拷贝数多的特点，常作为研究物种间系统进化及种下微进化的有效遗传标记(Avise *et al*.，1987；Harrison，1989；Avise，1994)。在昆虫系统地理学研究中，细胞色素 C 氧化酶亚基 COⅠ、COⅡ基因，以及 NADH 氧化还原酶亚基 ND1、ND5 基因等常作为分析亲缘关系较近的种、亚种及地理种群之间系统关系的分子工具(王备新和杨莲芳，2002；卜云和郑哲民，2005)。

本研究利用线粒体 COⅡ基因作为分子标记，对中国亚洲玉米螟 17 个地理种群的遗传结构及基因流水平进行了分析，探讨了亚洲玉米螟各地理种群之间的遗传分化程度，并初步推测了其种群演化格局可能的形成原因，为今后针对中国不同亚洲玉米螟发生区制定有效种群控制策略及转基因抗虫玉米的抗性治理策略提供科学依据。同时，本研究结果还将为亚洲玉米螟是否会进行远距离迁飞的问题在分子水平上提供一个佐证。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

本试验中所用的亚洲玉米螟种群，分别于2007年10月－2009年9月采集自全国17个不同地点的玉米田。种群样本、采集地点分布详情如表1所示。采回后单头幼虫置于离心管中，－80℃保存至 DNA 提取。

1.2 基因组 DNA 提取

单头玉米螟幼虫在 1×TE (Tris-EDTA，pH = 8.0)缓冲液中冰浴匀浆，应用组织/细胞基因组 DNA 快速提取试剂盒(Biomed)提取基因组 DNA (具体提取过程按照试剂盒说明书步骤进行操作)。提取的 DNA 样品取 3 ~ 4 μL 通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳来检测提取质量，检测合格后保存于 －20℃备用。

1.3 COⅡ基因 PCR 扩增及序列测定

根据 GenBank 中登录的亚洲玉米螟线粒体基因组序列信息(GenBank 登录号：AF467260)，通过软件 Primer Premier 5.0 设计用于扩增 COⅡ基因全长特异性引物(扩增产物包括 COⅡ基因两端的侧翼序列)。引物序列：COⅡ_F (正向引物)：5′-CCACCGGCAGAACATTCATAT-3′；COⅡ_R (反向引物)：5′-GACCATTACTTGCTTTCAGTCATC-3′，扩增目标片段为 824 bp。

PCR 反应总体系为 25 μL，含 2.5 μL 10×Ex Taq Buffer (Mg^{2+} plus)，0.1 mmol/L dNTPs，正/反向引物各0.5 μmol/L，1.0 μL 模板 DNA，0.5 U *Ex Taq*™ DNA 聚合酶(大连宝生物 TaKaRa)。PCR 扩增程序：94℃预变性 3 min，94℃ 30 s，60℃退火 1 min，72℃延伸 1 min，反应 35 个循环，72℃延伸 10 min。反应结束后，取 3 μL PCR 产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。电泳结果在 Dolphin-DOC (Wealtec Corp.)凝胶成像系统下进行观察。

电泳检测确认成功扩增后，将 PCR 产物经纯化后在 ABI 3730 XL 型自动分析仪上进行测序，测序实行正反双向测序，以提高所得序列的精确度。

1.4 序列整理及数据分析

测序结果通过 Chromas 软件读取，通过序列整理去除 COⅡ基因两端侧翼序列。将所得序列与 GenBank 中登陆的亚洲玉米螟线粒体 COⅡ基因 (GenBank 登录号：FJ435440)进行序列比对，同时在 NCBI 网站中进行 BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)，以明确得到的序列确为目标基因。利用Clustal X 1.8 (Thompson *et al*.，1997)进行多序列同源比对，并辅以人工校对。

表 1　亚洲玉米螟地理种群采集信息及供试个体数量

Table 1　Collecting data and number of assayed individuals of *Ostrinia furnacalis* in this study

序号 No.	种群代码 Population code	采集地点 Sampling location	地理坐标 Geo-coordinates	采集时间(月/年) Collection date (month/year)	分析个体数 Number of individuals assayed
1	KSh	黑龙江克山 Keshan, Heilongjiang	48.21°N, 125.66°E	10/2008	24
2	GZL	吉林公主岭 Gongzhuling, Jilin	43.31°N, 124.49°E	10/2008	24
3	ChF	内蒙古赤峰 Chifeng, Inner Mongolia	42.17°N, 118.58°E	10/2008	24
4	XZh	山西忻州 Xinzhou, Shanxi	38.24°N, 112.43°E	09/2008	24
5	HSh	河北衡水 Hengshui, Hebei	37.44°N, 115.42°E	10/2007	24
6	JZh	山东胶州 Jiaozhou, Shandong	36.17°N, 120.00°E	10/2007	24
7	GG	甘肃甘谷 Gangu, Gansu	34.84°N, 105.32°E	10/2008	24
8	MX	陕西眉县 Meixian, Shaanxi	34.41°N, 107.09°E	09/2009	24
9	LoY	河南洛阳 Luoyang, Henan	34.41°N, 112.27°E	10/2008	24
10	SuZ	安徽宿州 Suzhou, Anhui	33.38°N, 116.58°E	09/2008	27
11	YZh	江苏扬州 Yangzhou, Jiangsu	32.23°N, 119.26°E	11/2008	24
12	ChJ	新疆昌吉 Changji, Xinjiang	44.02°N, 87.18°E	10/2007	24
13	PX	四川郫县 Pixian, Sichuan	30.79°N, 103.87°E	10/2008	27
14	DY	浙江东阳 Dongyang, Zhejiang	29.16°N, 120.14°E	11/2008	24
15	KM	云南昆明 Kunming, Yunnan	25.13°N, 102.76°E	08/2009	24
16	GZh	广东广州 Guangzhou, Guangdong	23.08°N, 113.14°E	11/2008	24
17	SYa	海南三亚 Sanya, Hainan	18.14°N, 109.31°E	02/2008	27

应用软件 DnaSP 5.0 (Librado and Rozas, 2009)计算种群内及种群间的变异百分比、单倍型多样性 *Hd*、核苷酸多样性指数 π、种群间遗传分化程度参数 *Fst* 和 *Gst*、种群间核苷酸歧异度 *Dxy*、核苷酸平均差异数 *K* (Jukes-Cantor)等分子遗传学参数，计算种群间的基因流 *Nm*，并进行中性检验(Kimura, 1983; Tajima, 1983, 1989)。根据经纬度计算出各采集地两两之间的地理距离。通过 MEGA 4.0 软件 (Tamura *et al.*, 2007) 基于 Kimura 2-Parameter (K2P) 模型，以家蚕 *Bombyx mori* COⅡ基因作为外群(AB083339)，采用 NJ 邻接法(Neighbor-joining)构建单倍型系统发生树(Tamura *et al.*, 2004)。系统树各分支的置信度(bootstrap)均进行 1 000 次重复检验。利用 Arlequin 3.11 软件

(Excoffier *et al.*, 2005)计算种群间的遗传距离，并进行分子变异分析(AMOVA)。为了检验种群间的遗传分化是否与种群间的地理距离存在相关关系，将成对种群间的遗传距离［*Fst*/(1 − *Fst*)］矩阵与各种群采样点间的地理距离(km)的自然对数用 ZT 软件包检验两矩阵的相关性(Bonnet and Van de Peer, 2002)。

2 结果与分析

2.1 亚洲玉米螟线粒体 COⅡ基因核苷酸多态性及单倍型分析

亚洲玉米螟线粒体 COⅡ基因全长 682 bp，在 17 个种群共 413 条 COⅡ基因全长序列中共发现变异位点 34 个，约占分析位点总数的 4.99%，其中单一多态位点 11 个，简约信息位点 23 个。在所测序列中没有发现碱基缺失或插入现象。COⅡ基因 G + C 平均含量为 22.8%，说明该基因富含 A + T，表现出明显的碱基偏倚性。据报道，昆虫线粒体 COⅡ基因在不同的目中 A + T 含量范围不同，鳞翅目等完全变态类昆虫中 A + T 含量最高，达 75% 左右，与本研究所得结果相符(Jermiin and Crozier, 1994; Frati *et al.*, 1997)。在所有的核苷酸替换中，转换(transition)占 96.68%，其中 A 与 G 之间的转换占 45.03%，C 与 T 之间的转换占 51.65%；颠换(transversion)发生频率很低，仅占 3.32%；总体转换/颠换偏倚率 *R* 值为 13.31。据研究发现，转换/颠换率在不同进化距离的分类阶元之间具有明显差异，通常亲缘关系较近的分类阶元之间核苷酸替换表现为转换率大于颠换率，而在较为远缘的分类阶元间核苷酸替换则以颠换为主(Simon *et al.*, 1994; Frati *et al.*, 1997)。本研究发现亚洲玉米螟种内线粒体 COⅡ基因核苷酸多态位点变异类型以转换为主，验证了上述规律。

实验中获得的 413 条 COⅡ基因全长序列共定义了 35 种单倍型：Hap1 ~ Hap35 (GenBank 登录号：HM368402 ~ HM368436)，其中 Hap3 为共享单倍型，占所有样本的 37.53%，其他在种群中出现频率较高的单倍型依次为 Hap2 (14.04%)、Hap8 (9.20%)、Hap6 (8.47%)、Hap15 (8.23%)、Hap19 (7.75%)。另有 22 种单倍型均为相应种群所特有。

2.2 COⅡ基因各单倍型间的系统进化分析

采用邻接法 (NJ) 构建亚洲玉米螟 COⅡ基因 35 种单倍型之间的系统树，图中仅显示出 > 30% 的 bootstrap 置信度值(图 1)。由系统树可以看出，单倍型 Hap19, Hap32 和 Hap34 单独聚为 1 支(bootstrap 置信度为 99%)。其中单倍型 Hap19 出现于甘谷、郫县、昆明、宿州、忻州、扬州和三亚 7 个种群内，而聚类更紧密的 Hap32 和 Hap34 仅出现在忻州种群中。除这 3 种单倍型外，其余分别有 18 种和 14 种单倍型聚为 2 大分支(bootstrap 置信度为 79%)。

2.3 亚洲玉米螟不同地理种群的遗传多样性、种群间的基因流及遗传分化分析

对亚洲玉米螟 17 个地理种群 COⅡ基因序列采用 Tajima's *D* 值进行中性检验(表 2)，检测结果均

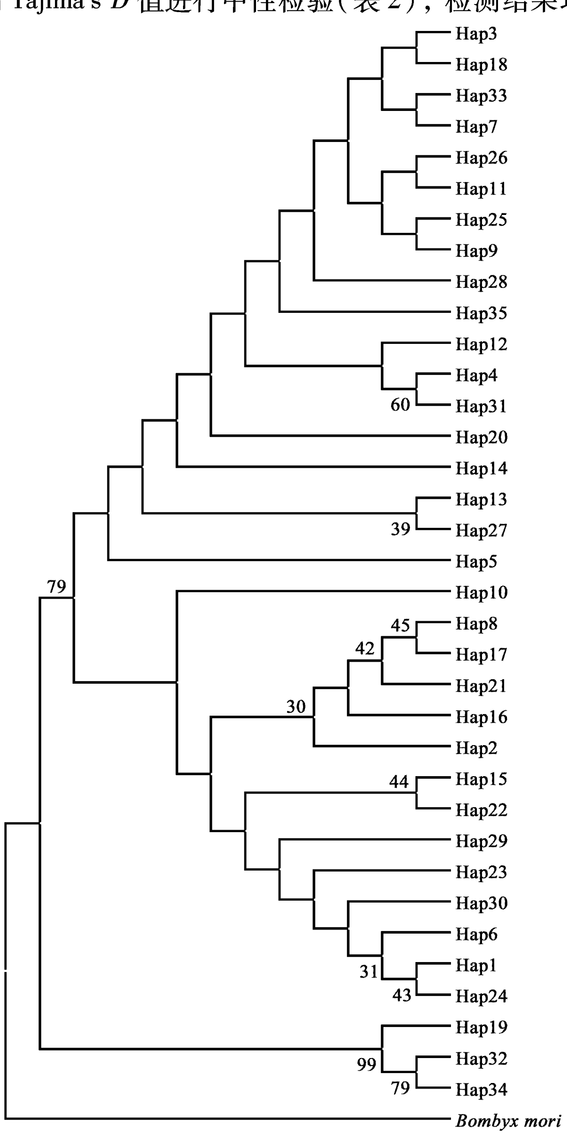


图 1 利用邻接法构建的亚洲玉米螟不同地理种群 COⅡ单倍型间的系统树

Fig. 1 Neighbor joining phylogenetic tree of haplotypes of different geographic populations of *Ostrinia furnacalis* based on COⅡ gene sequence

以家蚕为外群。*Bombyx mori* was used as the outgroup.

不显著，除 GG（甘谷）和 LoY（洛阳）2 个种群 $0.10 > P > 0.05$ 以外，其余种群均为 $P > 0.10$，说明中国的玉米螟种群在过去没有出现群体扩张和持续增长模式，群体大小保持相对稳定状态。

各种群 COⅡ单倍型多样性、核苷酸多样性及 Tajima's D 中性检验结果如表 2 所示。由结果可以看出，所测的玉米螟 17 个地理种群的总体单倍型多样性指数 Hd 为 0.811，种群间核苷酸多样性指数 π 为 0.00659。种群内单倍型多样度为 0.424 ~ 0.862，平均为 0.712，其中单倍型多样度最高的种群为 KM（昆明）种群，而 YZh（扬州）种群在所检测的种群中单倍型多样度最低。种群内核苷酸多样度范围在 0.00308 ~ 0.01015 之间，平均为 0.00509，其中核苷酸多样度最高和最低的种群分别为 GG（甘谷）和 DY（东阳）种群。

表 2　亚洲玉米螟不同地理种群 COⅡ基因单倍型、核苷酸多样性分析及 Tajima's *D* 中性检验

Table 2　COⅡ haplotype diversity, nucleotide diversity and Tajima's *D* neutrality test in different geographic populations of *Ostrinia furnacalis*

种群代码 Population code	单倍型多样性 Haplotype diversity (Hd)	核苷酸多样性 Nucleotide diversity (π)	核苷酸平均差异数 Average number of nucleotide difference (k)	Tajima's D	中性检验显著性 Statistical significance
KSh	0.630	0.00403	2.750	1.4597	Not significant, $P > 0.10$
GZL	0.731	0.00388	2.648	1.2528	Not significant, $P > 0.10$
ChF	0.830	0.00473	3.228	1.1127	Not significant, $P > 0.10$
XZh	0.500	0.00636	4.341	0.0465	Not significant, $P > 0.10$
HSh	0.779	0.00436	2.972	0.7254	Not significant, $P > 0.10$
JZh	0.779	0.00369	2.514	0.5574	Not significant, $P > 0.10$
GG	0.714	0.01015	6.920	1.8649	Not significant, $0.10 > P > 0.05$
MX	0.708	0.00413	2.814	1.5296	Not significant, $P > 0.10$
LoY	0.754	0.00431	2.938	1.7739	Not significant, $0.10 > P > 0.05$
SuZ	0.709	0.00526	3.590	-0.4693	Not significant, $P > 0.10$
YZh	0.424	0.00762	5.196	0.7571	Not significant, $P > 0.10$
ChJ	0.736	0.00325	2.217	-0.2621	Not significant, $P > 0.10$
PX	0.795	0.00563	3.838	-0.7838	Not significant, $P > 0.10$
DY	0.632	0.00308	2.103	-0.4562	Not significant, $P > 0.10$
KM	0.862	0.00694	4.732	0.1414	Not significant, $P > 0.10$
GZh	0.808	0.00379	2.583	1.1819	Not significant, $P > 0.10$
SYa	0.709	0.00526	3.590	-0.4693	Not significant, $P > 0.10$
总群体 Total	0.811	0.00659	4.494	-0.4134	Not significant, $P > 0.10$

Fst（F-statistic）可表示不同群体间等位基因频率的变异，是反映群体进化历史的重要参数，可在一定程度上揭示种群间基因流和遗传漂变的程度。而基因流则可以揭示出群体间可能的基因渗透及影响遗传分化的遗传现象。DnaSP 5.0 软件计算结果显示，17 个种群间的基因流平均为 2.02，总体遗传分化系数 Gst 为 0.110，总群体的固定系数 Fst 为 0.235。种群间的核苷酸平均差异数 Kxy 在 2.105 ~10.894 之间，平均为 4.556；核苷酸歧异度 Dxy 在 0.0031 ~0.0160 之间，平均为 0.0067（表 3）；种群间 Fst 值的范围为 -0.0398 ~0.6420，其中 YZh（扬州）种群与其他种群的遗传分化程度最高（表 4）。

表 3 亚洲玉米螟成对种群间的核苷酸平均差异数（*Kxy*）（上三角）与核苷酸歧异度（*Dxy*）（下三角）

Table 3 Pairwise average number of nucleotide differences（*Kxy*）（above the diagonal）and nucleotide divergence（*Dxy*）（below the diagonal）between different geographic populations of *Ostrinia furnacalis*

	KSh	GZL	ChF	XZh	HSh	JZh	GG	MX	LoY	SuZ	YZh	ChJ	PX	DY	KM	GZh	SYa
KSh		2.987	2.941	4.813	3.031	2.934	6.580	2.944	3.045	3.295	10.854	3.056	3.478	2.980	3.854	2.865	3.295
GZL	0.0044		2.980	5.174	3.085	3.105	5.920	2.974	3.031	3.209	10.384	3.254	3.245	3.219	3.721	2.835	3.209
ChF	0.0043	0.0044		5.063	3.176	3.135	6.469	3.085	3.160	3.390	10.785	3.260	3.528	3.190	3.944	3.007	3.390
XZh	0.0071	0.0076	0.0052		4.406	3.854	7.146	4.232	4.389	5.241	9.076	3.556	4.966	3.514	5.444	5.319	5.241
HSh	0.0044	0.0045	0.0047	0.0065		2.732	6.540	2.788	2.850	3.309	10.667	2.717	3.419	2.641	3.913	3.165	3.309
JZh	0.0043	0.0046	0.0046	0.0056	0.0040		6.472	2.612	2.722	3.383	10.358	2.319	3.326	2.268	3.878	3.219	3.383
GG	0.0097	0.0087	0.0095	0.0105	0.0096	0.0095		6.359	6.417	6.469	7.896	6.503	6.279	6.507	6.490	6.403	6.469
MX	0.0043	0.0044	0.0045	0.0062	0.0041	0.0038	0.0093		2.766	3.269	10.406	2.594	3.304	2.522	3.819	3.096	3.269
LoY	0.0045	0.0044	0.0046	0.0064	0.0042	0.0040	0.0094	0.0041		3.289	10.500	2.726	3.372	2.639	3.875	3.151	3.289
SuZ	0.0048	0.0047	0.0050	0.0077	0.0049	0.0050	0.0095	0.0048	0.0048		10.540	3.506	3.711	3.401	4.090	3.261	3.457
YZh	0.0159	0.0152	0.0149	0.0133	0.0156	0.0152	0.0116	0.0153	0.0154	0.0155		10.177	10.113	10.192	9.990	10.894	10.540
ChJ	0.0045	0.0048	0.0048	0.0052	0.0040	0.0034	0.0095	0.0038	0.0040	0.0051	0.0149		3.361	2.105	3.951	3.406	3.506
PX	0.0051	0.0048	0.0052	0.0073	0.0050	0.0049	0.0092	0.0049	0.0049	0.0054	0.0148	0.0049		3.316	4.170	3.481	3.711
DY	0.0044	0.0047	0.0047	0.0052	0.0039	0.0033	0.0095	0.0037	0.0039	0.0050	0.0149	0.0031	0.0049		3.899	3.330	3.401
KM	0.0056	0.0055	0.0058	0.0080	0.0057	0.0057	0.0095	0.0056	0.0057	0.0060	0.0146	0.0058	0.0061	0.0057		3.865	4.090
GZh	0.0042	0.0042	0.0044	0.0078	0.0046	0.0047	0.0094	0.0045	0.0046	0.0048	0.0160	0.0050	0.0051	0.0049	0.0057		3.261
SYa	0.0048	0.0047	0.0050	0.0077	0.0049	0.0050	0.0095	0.0048	0.0048	0.0051	0.0155	0.0051	0.0048	0.0050	0.0060	0.0048	

表 4 亚洲玉米螟成对种群间的固定系数（*Fst* 值）（上三角）与地理距离（km）的自然对数值（下三角）

Table 4 Pairwise *Fst* values（above the diagonal）and the natural logarithm of geographical distance（km）（below the diagonal）between populations of *Ostrinia furnacalis*

	KSh	GZL	ChF	XZh	HSh	JZh	GG	MX	LoY	SuZ	YZh	ChJ	PX	DY	KM	GZh	SYa
KSh		0.0965	−0.0164	0.2633	0.0560	0.1029	0.2652	0.0549	0.0660	0.0379	0.6340	0.1872	0.0531	0.1858	0.0294	0.0115	0.0379
GZL	6.31		0.0140	0.3246	0.0891	0.1687	0.1919	0.0815	0.0784	0.0282	0.6223	0.2523	0.0006	0.2621	0.0083	0.0192	0.0282
ChF	6.75	6.21		0.2525	0.0238	0.0842	0.2156	0.0207	0.0242	−0.0055	0.6095	0.1649	−0.0015	0.1645	−0.0090	−0.0212	−0.0055
XZh	7.34	7.06	6.52		0.1701	0.1107	0.2121	0.1547	0.1708	0.2434	0.4747	0.0778	0.1766	0.0833	0.1668	0.3182	0.2434
HSh	7.29	6.92	6.38	5.62		−0.0042	0.2437	−0.0377	−0.0371	0.0085	0.6171	0.0451	0.0040	0.0391	0.0156	0.0702	0.0085
JZh	7.26	6.78	6.52	6.56	6.07		0.2711	−0.0199	−0.0016	0.0977	0.6278	−0.0201	0.0450	−0.0179	0.0658	0.1569	0.0977
GG	7.72	7.55	7.25	6.61	6.86	7.20		0.2346	0.2318	0.1877	0.2328	0.2975	0.1434	0.3067	0.1022	0.2321	0.1877
MX	7.69	7.50	7.19	6.46	6.71	7.08	5.13		−0.0398	0.0205	0.6151	0.0302	−0.0065	0.0251	0.0120	0.0750	0.0205
LoY	7.55	7.28	6.93	6.05	6.09	6.59	6.46	6.16		0.0075	0.6127	0.0542	−0.0048	0.0450	0.0103	0.0715	0.0075
SuZ	7.51	7.17	6.90	6.49	6.14	6.09	6.96	6.78	6.03		0.5832	0.1719	−0.0008	0.1631	−0.0174	0.0029	−0.0385
YZh	7.53	7.18	7.01	6.82	6.52	6.09	7.19	7.05	6.54	5.64		0.6358	0.5534	0.6420	0.5031	0.6278	0.5832
ChJ	8.01	8.01	7.85	7.70	7.82	7.98	7.53	7.61	7.79	7.94	8.04		0.0993	−0.0261	0.1206	0.2469	0.1719
PX	7.90	7.74	7.51	7.04	7.17	7.38	6.15	6.22	6.78	7.12	7.29	7.64		0.1042	−0.0276	0.0305	−0.0008
DY	7.68	7.39	7.28	7.12	6.93	6.66	7.34	7.22	6.85	6.36	5.86	8.12	7.36		0.1234	0.2468	0.1631
KM	8.10	7.95	7.78	7.45	7.51	7.63	7.01	7.01	7.23	7.39	7.49	7.84	6.46	7.48		0.0109	−0.0174
GZh	8.01	7.82	7.69	7.43	7.39	7.38	7.32	7.24	7.14	7.09	7.08	8.12	7.14	6.88	6.98		0.0029
SYa	8.21	8.06	7.94	7.72	7.71	7.73	7.55	7.51	7.51	7.52	7.53	8.18	7.32	7.41	6.94	6.52	

通过 AMOVA 分子变异分析结果可以看出（表 5），中国亚洲玉米螟 17 个地理种群之间的方差组分为 0.5363，占方差比率的 23.55%；种群内部的方差组分为 1.7411，占方差比率的 76.45%，且差异显著（$P < 0.05$）。说明中国亚洲玉米螟的遗传分化主要来自种群内部。

为了检测亚洲玉米螟不同种群之间的遗产分化程度是否与地理隔离有关，通过 ZT 软件包进行 Mantel 检验，计算成对种群间的遗传距离[*Fst*/(1 – *Fst*)]矩阵和各采集地点间的地理距离(km)的自然对数矩阵之间的相关系数，得到遗传距离与地理距离之间的相关系数 *r* 为 –0.136（$P=0.1134>0.05$，10 000 次随机抽样），表明两者之间未呈现出显著的相关性。

表 5　亚洲玉米螟 17 个地理种群线粒体 DNA COⅡ基因序列变异的分子变异分析

Table 5　Molecular variance (AMOVA) analysis of mitochondrial DNA COⅡ gene sequences in 17 geographic populations of *Ostrinia furnacalis*

变异来源 Source of variation	自由度 *df*	平方和 Sum of squares	方差组分 Variance components	方差比率 Percentage of variation	*P* 值 *P* value
种群间 Among populations	16	236.265	0.5363 Va	23.55	<0.0001
种群内 Within populations	396	689.469	1.7411 Vb	76.45	<0.0001
总变异 Total	412	925.734	2.2774	100	

因定系数 Fixation index，*Fst*：0.2355.

3　讨论

一个物种对环境变化的适应能力主要取决于其群体内部的遗传多样性和相应的遗传结构。物种内基因流的模式与强度，及其与种群遗传结构的关系，是重要的进化生态学问题(祖元刚等，1999)。种群间的遗传差异主要是突变、遗传漂变、选择和基因流等因素相互作用的结果。其中，突变、遗传漂变和选择压力会促进种内遗传分化的产生；而基因流则通过配子、个体或整个群体的迁移，使种群间保持遗传上的相似性，弱化群体间的遗传差异(Whitlock and McCauley，1999)。目前对群体间基因流的研究，主要是通过考察不同群体间的等位基因频率或 DNA 序列间的差异来实现。

在玉米螟种群分化及基因流方面，国内外已有一些相关研究报道。如法国的欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* (Hübner)因寄主植物分化，致使不同食性的种群产生了遗传分化，并形成生殖隔离，两品系之间的基因流受到很大程度的阻碍(Martel *et al.*，2003)。Coates 等(2004)通过分析欧洲玉米螟的 COⅠ和 COⅡ基因序列，发现北美欧洲玉米螟不同地理种群和不同化性种群均存在着遗传分化。在国内也有关于亚洲玉米螟种群分化的初步研究，孙姗等(2000)用 RAPD 的方法研究发现中国亚洲玉米螟 5 个地理种群之间已经产生了一定程度的遗传分化。刘宁等(2003)同样利用 RAPD 分子标记技术，对中国不同玉米种植区亚洲玉米螟 13 个地理种群进行遗传差异分析，表明其种群间的遗传差异和地理位置存在一定的相关性，推测中国亚洲玉米螟的遗传分化主要是由于地理隔离阻碍了基因交流而产生。

本研究采用线粒体 DNA 分子标记的方法，对中国亚洲玉米螟不同地理种群的遗传分化和基因流进行了更为系统、全面的研究。据报道欧洲玉米螟作为外来入侵种，在 20 世纪初才由欧洲传入美国，北美的欧洲玉米螟种群经历了传入、选择或线粒体基因的遗传漂变等遗传瓶颈效应，因此分布在北美的欧洲玉米螟种群线粒体基因多态性水平很低(Coates *et al.*，2004)。而本研究结果发现，中国亚洲玉米螟的 mtDNA COⅡ基因存在 34 个多态性位点共 35 种单倍型，总群体的单倍型多样性指数 *Hd* 为 0.811，种群内的单倍型多样度平均为 0.712，表明中国亚洲玉米螟的线粒体基因具有较高的多态性，推测这主要是由于亚洲玉米螟在玉米引入中国之前以谷子和其他杂草为寄主，在中国进化的历史比较悠久，因而具有非常丰富的遗传基础。单倍型多样度和核苷酸多样度在中国不同亚洲玉米螟种群中存在差异，其原因可能是由于亚洲玉米螟在中国的分布范围十分广泛，其不同种群所处的自然生态环境不同，在自然选择及寄主植物的选择作用下，种群的遗传结构已发生了较大变异。

固定系数 *Fst*（或称基因分化系数）作为遗传距离的一种常用测度参数，可反映出不同物种或种群之间的基因差异程度。中国亚洲玉米螟不同地理种群之间的 *Fst* 值在 –0.0398 ~ 0.6420 之间，总群体的 *Fst* 值为 0.234。据报道，基因分化系数的值介于 0 ~ 0.05 之间表示群体间遗传分化程度很弱；0.05 ~ 0.15 为分化程度中等；0.15 ~ 0.25 为分化程度较大；大于 0.25 为分化程度很大(Rousset，1997)。因此从总体上来看，不同地理种群之间的

遗传分化程度较高。通过中性检验分析结果可以推测，中国的亚洲玉米螟种群在过去没有出现群体扩张和持续增长模式，群体大小保持相对稳定状态。

基因流是种群遗传结构均质化的主要因素之一，具有高水平基因流的物种往往比具有有限基因流的物种遗传分化小，Whitlock 和 McCauley(1999)认为当 $Nm>4$ 时，种群间的基因交流比较充分，匀质化作用足以抵制遗传漂变的作用，防止种群间遗传分化的产生。本研究中，由 Nei 氏指数计算的总群体基因流 $Nm=2.02<4$，表明种群间的基因流较小，这与玉米螟群体间遗传分化程度较高的结论相对应。同时也反映出，虽然亚洲玉米螟成虫扩散能力较强(王振营等，1994)，但它们在不同地理种群间的迁移扩散机会相对有限，从而限制了种群之间的基因交流。这一结果为今后制定转基因抗虫玉米的抗性治理策略中庇护所的设置范围和距离提供了科学依据。

通过对单倍型在不同种群中的分布情况及各单倍型的系统进化分析，结果发现单倍型 Hap3 是 17 个亚洲玉米螟种群的共享主体单倍型，其可能是玉米螟进化历史中出现的较为稳定、环境适应性较强的一种单倍型。从各单倍型在邻接树(NJ 树)中的分布和各单倍型在实际地理种群中的分布情况来看，单倍型之间和其分布的地理单元之间并没有明显的对应关系，各地理种群具有的单倍型都处于相互散布的、比较混杂的分布格局中。另外，通过各种群间遗传距离及地理距离的相关性分析，未发现二者具有显著的相关性。因此，地理隔离并不是造成中国亚洲玉米螟种群间遗传分化的主导因素。关于亚洲玉米螟在中国的地理遗传分布格局的演化形成的原因，有待于今后进一步深入研究。

参 考 文 献(References)

Avise JC, 1992. Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. *Oikos*, 63: 62 - 76.

Avise JC, 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman & Hall, New York. 431 - 470.

Avise JC, 1998. The history and preview of phylogeograhy: a personal reflection. *Mol. Ecol.*, 7: 371 - 379.

Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 18: 489 - 522.

Bonnet E, Van de Peer Y, 2002. ZT: a software tool for simple and partial Mantel tests. *J. Stat. Software*, 7: 1 - 12.

Bu Y, Zheng ZM, 2005. Roles and status of cytochrome oxidase II gene in the research of insect molecular systematics. *Chin. Bull. Entomol.*, 42(1): 18 - 22. [卜云，郑哲民，2005. COⅡ基因在昆虫分子系统学研究中的作用和地位. 昆虫知识，42(1): 18 - 22]

Coates BS, Sumerford DV, Hellmich RL, 2004. Geographic and voltinism differentiation among North American *Ostrinia nubilalis* (European corn borer) mitochondrial cytochrome c oxidase haplotypes. *J. Insect Sci.*, 4: 35.

Excoffier LG, Laval S, Schneider S, 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinformatics*, 1: 47 - 50.

Frati F, Simon C, Sullivan J, Swofford DL, 1997. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene in Collembola. *J. Mol. Evol.*, 44: 145 - 158.

Harrison RG, 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol. Evol.*, 4: 6 - 11.

Hu MJ, Sun BX, 1979. Integrated Control of Corn Borer. Integrated Pest Management of Major Pest Insects in China. Science Press, Beijing. 281 - 300. [胡明峻，孙伯欣，1979. 玉米螟综合防治. 中国主要害虫综合防治. 北京: 科学出版社. 281 - 300]

Jermiin LS, Crozier RH, 1994. The cytochrome b region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraponera rufoniger*: sequence divergence in Hymenoptera may be associated with nucleotide content. *J. Mol. Evol.*, 38: 282 - 294.

Kimura M, 1983. The Neutral Theory of Molecular Evolution. Cambridge University Press, Cambridge, Massachusetts.

Librado P, Rozas J, 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451 - 1452.

Liu N, Wen LP, Wang ZY, He KL, Bai SX, 2003. RAPD-PCR analysis of different geographic populations of Asian corn borer (*Ostrinia furnacalis*). In: Cheng ZM ed. Science and Technology Innovation and Plant Protection. China Agricultural Science and Technology Press, Beijing. 320 - 325. [刘宁，文丽萍，王振营，何康来，白树雄，2003，亚洲玉米螟不同地理种群的 RAPD-PCR 分析. 见: 成卓敏主编. 科技创新与绿色植保. 北京: 中国农业科技出版社. 320 - 325]

Martel C, Réjasse A, Rousset F, Bethenod MT, Bourguet D, 2003. Host-plant-associated genetic differentiation in northern French populations of the European corn borer. *Heredity*, 90: 141 - 149.

Rousset F, 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145: 1219 - 1228.

Simon C, Frati F, Beckenbach AT, Crespi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87: 651 - 701.

Sun S, Xu ML, Wang RJ, Li SW, 2000. A preliminary study on differentiation among geographical populations of Asian corn borer (*Ostrinia furnacalis*) using RAPD method. *Acta Entomol. Sin.*, 43 (1): 103 - 106. [孙姗，徐茂磊，王戎疆，李绍文，2000.

RAPD 方法用于亚洲玉米螟地理种群分化的研究. 昆虫学报, 43(1): 103 – 106]

Tajima F, 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105: 437 – 460.

Tajima F, 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585 – 595.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24: 1596 – 1599.

Tamura K, Nei M, Kumar S, 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 11030 – 11035.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876 – 4882.

Wang BX, Yang LF, 2002. Phylogenetic utilities of mitochondrial DNA sequences in the study of insect systematics. *Chin. Bull. Entomol.*, 39(2): 88 – 92. [王备新, 杨莲芳, 2002. 线粒体 DNA 序列特点与昆虫系统学研究. 昆虫知识, 39(2): 88 – 92]

Wang J, Li M, Wei FW, Liu DZ, Meng SJ, Feng ZJ, 2001. Molecular phylogeography and applications. *Acta Zootaxon. Sin.*, 26(4): 431 – 439. [王静, 李明, 魏辅文, 刘定震, 蒙世杰, 冯祚建, 2001. 分子系统地理学及其应用. 动物分类学报, 26(4): 431 – 439]

Wang ZY, Lu X, He KL, Zhou DR, 2000. Review of history, present situation and prospect of the Asian maize borer research in China. *J. Shenyang Agric. Univ.*, 31(5): 402 – 412. [王振营, 鲁新, 何康来, 周大荣, 2000. 我国研究亚洲玉米螟历史、现状与展望. 沈阳农业大学学报, 31(5): 402 – 412]

Wang ZY, Zhou DR, Song YY, Li BX, Zhang GY, Gao SL, Liu Y, Zheng L, Wang YS, Xie WM, Li WD, Pan YC, 1994. Studies on behaviour of dispersal and possibility of migration in adult overwintering generation Asian corn borer by using release and recapture technique. *Acta Phytophyl. Sin.*, 21: 25 – 30. [王振营, 周大荣, 宋彦英, 李璧铣, 张广义, 高书兰, 刘勇, 郑礼, 王蕴生, 谢为民, 李文德, 潘永成, 1994. 亚洲玉米螟越冬代成虫扩散行为与迁飞可能性研究. 植物保护学报, 21: 25 – 30]

Whitlock MC, McCauley DE, 1999. Indirect measures of gene flow and migration: $Fst \neq 1/(4Nm+1)$. *Heredity*, 82: 117 – 125.

Zu YG, Sun M, Kang L, 1999. Theory, Method, and Application of Molecular Ecology. Higher Education Press, Beijing. 30 – 37. [祖元刚, 孙梅, 康乐, 1999. 分子生态学理论、方法和应用. 北京: 高等教育出版社. 30 – 37]

（责任编辑：袁德成）